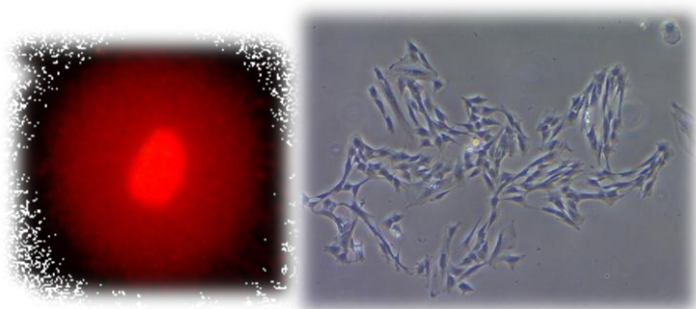


TRABAJO DE FIN DE GRADO

Facultad de Ciencias

“Cultivo y caracterización de células mesenquimales de distintas especies animales de interés en veterinaria”

Efecto de un ambiente inflamatorio sobre las características de las MSCs equinas



DIRECTORES

Clementina Rodellar Penella e Inmaculada Martín Burriel

ALUMNA

Blanca Salinas Badía
Junio 2015

TFG ofertado por el Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal.

Lugar de realización: Departamento de Anatomía, Embriología y Genética animal.

Clementina Rodellar Penella e Inmaculada Martín Burriel, Profesoras Titulares del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICAN QUE:

El trabajo que se presenta bajo el título “Cultivo y caracterización de células mesenquimales de distintas especies animales de interés en veterinaria” que se recoge en la presente Memoria, de la que es autora **Blanca Salinas Badía**, ha sido realizado en el Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza bajo nuestra dirección.

Zaragoza, 26 de Junio de 2015

Fdo. Clementina Rodellar Penella

Fdo. Inmaculada Martín Burriel

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1.Células madre.....	3
2.2.Células madre mesenquimales.....	3
2.2.1. Aislamiento de Células Madre Mesenquimales.....	4
2.3.Posibilidades de futuro de las MSCs.....	4
2.3.1. La especie equina como modelo animal en Terapia Celular.....	5
2.4.Caracterización de las MSCs.....	6
2.4.1. Potencial de autorrenovación y proliferación.....	6
2.4.2. Marcadores de superficie.....	7
2.4.3. Potenciales de diferenciación.....	8
2.4.4. Propiedades inmunológicas.....	8
2.4.4.1. Valoración del daño del DNA.....	10
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
4.1.Animales.....	12
4.2.Cultivo y expansión de las MSCs.....	12
4.2.1. Método de expansión.....	12
4.2.2. Método de congelación.....	13
4.2.3. Método de descongelación.....	13
4.2.4. Método de resiembra.....	13
4.3.Valoración del efecto de citoquinas sobre las MSCs.....	13
4.3.1. Diseño del experimento.....	13
4.3.2. Efecto sobre la viabilidad de las MSCs.....	13
4.3.2.1.Sobre la capacidad de proliferación.....	14
4.3.2.2.Daño del DNA nuclear.....	14
4.3.2.2.1. Microscopía de fluorescencia.....	15
4.3.3. Expresión de genes relacionados con la inmunomodulación.....	15
4.3.3.1.Extracción de mRNA.....	15
4.3.3.2.RT-qPCR.....	16
4.4. Análisis estadístico.....	17
4.4.1. Test t de Student para muestras pareadas.....	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
5.1.Proliferación celular.....	18
5.2.Efecto de las citoquinas sobre el daño del DNA nuclear en las MSCS.....	20
5.3.Expresión de genes relacionados con la inmunomodulación.....	21
6. CONCLUSIONES.....	23
7. BIBLIOGRAFÍA.....	24
8. ANEXOS.....	26

1. RESUMEN

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células madre adultas que tienen capacidad de autorrenovación y de diferenciación a linajes derivados de las tres capas embrionarias. Recientemente las investigaciones acerca de estas células se están centrando en su capacidad inmunomoduladora que puede ser incrementada por la estimulación de las MSCs con citoquinas pro-inflamatorias. Por ello resulta de vital importancia el estudio de dicha estimulación como paso previo a la utilización de estas células en la terapia celular *in vivo*.

Las patologías del aparato locomotor tienen una gran incidencia en la especie equina, siendo esta especie el mejor modelo animal para la extrapolación de resultados a la resolución de problemas muculoesqueléticos en la especie humana.

El objetivo principal del presente trabajo es analizar la respuesta de las MSCs de la especie equina obtenidas de médula ósea (BM-MSCs) a un ambiente inflamatorio constituido por $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$ a una concentración de 5ng/ml en el medio de cultivo. Se utilizaron BM-MSCs de tres animales y tras un periodo de 12 y 72h en presencia de dicha mezcla de citoquinas se analizó la capacidad de proliferación, el daño producido en su DNA nuclear y la expresión de genes relacionados con la inmunomodulación (*IL-6* y *COX-2*) por RT-qPCR.

Los resultados obtenidos muestran que la adición de citoquinas disminuye la capacidad de proliferación de las BM-MSCs equinas, siendo este efecto mucho más acusado tras 72h horas de exposición. Respecto al efecto sobre la integridad del DNA nuclear no se ha observado un daño significativo en ninguno de los dos tiempos considerados. Los resultados obtenidos muestran un gran aumento en la expresión génica tanto de *IL-6* como de *COX-2* en ambos tiempos de exposición, más marcado en ambos genes a las 72h.

Se demuestra mediante el presente trabajo que la estimulación de las BM-MSCs equinas mediante la adición de citoquinas puede tener un efecto significativo sobre características importantes de las MSCs.

ABSTRACT

The mesenchymal stem cells (MSCs) are adult stem cells which have two main features such as auto-renewal and differentiation into lineages derived from the three embryonic layers. Recent studies about these cells are focused on its immunomodulatory properties, which can be incremented by stimulation with pro-inflammatory cytokines. Therefore, the study of this stimulation is of main importance before the application of these cells in *in vivo* cellular therapy.

The locomotor system injuries have a great impact in the equine species, horses being the best animal model to extrapolate the results to these pathologies in the human species.

The main objective of the present work is to analyse the response of the equine MSCs obtained from bone marrow (BM-MSCs) to an inflammatory environment constituted by IFN γ and TNF α at 5ng/ml in the culture medium. BM-MSCs from three animals were used and, after a period of 12 and 72h of exposure to that mix of cytokines, the proliferation ability, the damage caused in its nuclear DNA and the expression of genes related to the immunomodulation (*IL-6* and *COX-2*) were all analysed.

The results obtained demonstrated that the addition of cytokines decreases the MSCs capacity of proliferation, this effect being much more evident after 72h of exposure. With respect to the nuclear DNA damage produced, a significant effect has not been observed in either of the two evaluated times. The RT-qPCR results obtained show a great rise in the expression of both *IL-6* and *COX-2* at the two times, much more significant at 72h.

It has been demonstrated by this research that the stimulation of MSCs with the addition of cytokines can have a relevant effect on their important characteristics.

2. ANTECEDENTES

2.1. CÉLULAS MADRE

Las células madre son aquellas células no diferenciadas, que tienen la doble capacidad de autorrenovarse (formar células idénticas a sus progenitoras) y diferenciarse (generar uno o más tipos de células maduras con funciones específicas).

Dichas células pueden clasificarse en función de diferentes criterios. De acuerdo al potencial de diferenciación [1] que posean las células madre pueden ser:

- Totipotentes. Pueden generar organismos completos, tanto tejidos embrionarios, como extraembrionarios, es decir, pueden formar todos los tipos celulares.
- Pluripotentes. Son capaces de diferenciarse en cualquier célula de las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo).
- Multipotentes. Tienen la habilidad de diferenciarse a sólo uno de los linajes celulares, generar sólo tejidos de la capa embrionaria de la que provienen.

Otro método de clasificación de las células madre tiene en cuenta el origen del que proceden:

- Células madre embrionarias. Proviene de la masa celular interna del blastocisto, presentes en las primeras etapas de desarrollo del embrión. Son células totipotenciales.
- Células madre germinales. Aisladas de los esbozos gonadales de embriones, localizados en la cresta gonadal que dará lugar a óvulos y espermatozoides. Son células con una capacidad de diferenciación similar a las células madre embrionarias.
- Células madre fetales. Se encuentran en los tejidos y órganos fetales (sangre, hígado, pulmón) y presentan características similares a sus homólogos en tejidos adultos. Su procedencia no está del todo clara y, por lo tanto, tampoco su capacidad de diferenciación.
- Células madre adultas. Presentes en los tejidos y órganos de los individuos adultos, pueden encontrarse en la mayoría de los órganos. Dentro de esta clase se conocen cerca de 20 tipos celulares, entre ellas, las células madre mesenquimales. Se encuentran en espacios denominados nichos y se trata de células pluripotentes.

2.2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales, MSCs (Mesenchymal Stem/Stromal Cells), son un tipo de células madre adultas que derivan de la capa embrionaria del mesodermo.

Fueron descubiertas y aisladas de la médula ósea por primera vez por Friedenstein y colaboradores en 1970 y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos [2]. Sin embargo, estudios recientes afirman que este tipo de células pueden diferenciarse también a células con origen en otras capas embrionarias, como son las células neuronales [3] o las pancreáticas [4].

Este tipo celular ha sido continuamente renombrado por diferentes estudios, lo que genera controversia sobre su nomenclatura. El primer nombre que recibieron fue el de CFU-Fs (Fibroblastic Colony-Forming Units, unidades formadoras de colonias de morfología de fibroblasto), ya que, tal y como habían visto Friedenstein y colaboradores (1970), tenían la capacidad de formar colonias sobre la superficie de las placas de cultivo. Otros nombres por las que son reconocidas son “células estromales medulares”, “células precursoras estromales” o “células madre mesenquimales”.

Para solucionar estos problemas conceptuales, en 2005, la ISCT (International Society for Cellular Therapy, Sociedad Internacional de Terapia Celular) propuso para estas células adherentes al plástico con forma de fibroblastos humanos el término de “células mesenquimales”, independientemente del tejido del que fuesen aisladas, y que el término “célula madre mesenquimal” fuese usado sólo para células que reuniesen claramente los criterios establecidos por las células madre [5]. Sin embargo, se decidió aplicar el acrónimo MSC (Mesenchymal stem/stromal cell) para referirse a todas ellas.

El hecho de que las MSCs estén formadas por una mezcla heterogénea de poblaciones y la no existencia de un único marcador de superficie para su identificación positiva entre los otros tipos celulares, llevó en 2006 a la ISCT a declarar los criterios mínimos para definir a las células mesenquimales [6].

Los criterios mínimos que definen este tipo de células son:

- Capacidad de adherencia al plástico y de formar colonias.
- Expresión de ciertos antígenos específicos de superficie como CD73, CD90 y CD105 por más de un 95% de las células y ausencia, o expresión por menos de un 2% de la población celular, de otros antígenos como CD11b o CD14, CD19 o CD79 α , CD34, CD45 y HLA-II.
- Capacidad de diferenciación a adipocito, osteocito y condrocito.

2.2.1. Aislamiento de Células Madre Mesenquimales

Estas células, como se ha visto hasta ahora, pueden obtenerse de la Médula Ósea (BM-MSCs, Bone Marrow-MSCs), del Tejido Adiposo (AT-MSCs, Adipose Tissue-MSCs) [7] y de otros tejidos como sangre periférica, pulmón, músculo, líquido sinovial y encías. También se pueden aislar de cordón umbilical, líquido amniótico y placenta [8].

Las células que provienen del tejido adiposo presentan algunas diferencias con respecto a las de la médula ósea; expresan CD34, se pueden obtener más cantidad de células ya que el tejido de partida es mayor y, respecto a las MSCs equinas, muestran una mayor tasa de proliferación que las BM-MSCs [9].

2.3. POSIBILIDADES DE FUTURO DE LAS MSCs

Las MSCs presentan unas propiedades que las hacen muy atractivas para la **terapia celular**, es decir, el trasplante de células vivas a un organismo para reparar un tejido o funciones perdidas. A diferencia de las células madre embrionarias, las MSC no presentan los problemas de carácter ético y moral de trabajar con ellas ni forman teratomas *in vivo* al usarlas como terapia [10]. Otra ventaja que presentan es que con ellas se puede realizar una terapia celular autóloga.

Este tipo de células han demostrado ser una gran herramienta en la terapia celular debido a su potencial de diferenciación y a su capacidad de autorrenovación, lo que permite obtener grandes cantidades para su aplicación en terapia. Son las candidatas idóneas para reparar y regenerar tejidos dañados, debido a su plasticidad y a la habilidad de diferenciación a tipos celulares de tejidos conectivos. No sólo son de interés esas propiedades, también lo es su capacidad de inmunorregulación.

Hasta hace un tiempo, se creía que las MSCs se caracterizaban por ser hipoinmunogénicas o “inmuno-privilegiadas”, es decir, pasaban desapercibidas para el sistema inmune. Sin embargo, estudios recientes revelan que son “inmuno-evasivas”, lo que quiere decir que el sistema inmune las detecta (se producen anticuerpos contra ellas y rechazo inmune de donantes de MSCs alogénicos) pero, en determinadas condiciones, estas células pueden evadirlo, dependiendo de la capacidad que tengan las células de expresar el MHC-II y de inhibir a los linfocitos T [11]. Este hecho es importante en terapias auto y alogénicas, ya que no generarían rechazo inmunológico en el paciente.

Algunos ejemplos de patologías en las que se ha aplicado terapia celular utilizando diversas fuentes de células mesenquimales son en el tratamiento de lesiones óseas, cartilaginosas, tendinosas, cardíacas y en terapia inmunomoduladora. Las MSCs se consideran muy buen tratamiento para la enfermedad de injerto contra huésped por sus propiedades inmunosupresoras *in vivo* e *in vitro* y su baja inmunogenicidad. Actualmente hay 504 ensayos clínicos en humana que se están realizando con MSCs como futuro tratamiento para enfermedades como colitis ulcerosa, diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, osteoartritis, cirrosis o la enfermedad de Crohn [12].

El uso de las MSCs como producto clínico está siendo continuamente evaluado y analizado. Entre los riesgos se incluyen la probabilidad de la formación de tumores o la inapropiada diferenciación de las MSCs, la transmisión de enfermedades infecciosas a partir de productos contaminados y traumatismos en la zona de administración. Los datos experimentales de los que se dispone sugieren que las MSCs no forman tumores *in vivo*. Además, no ha sido declarado ningún caso de tumores en pacientes tanto humanos como veterinarios tratados con estas células (caballos monitorizados durante al menos 6 años) [10].

2.3.1. La especie equina como modelo animal en terapia celular

El caballo se utiliza como modelo para la investigación en terapia celular, en especial, para tratamientos orientados hacia la regeneración de lesiones de los tejidos musculoesqueléticos, es decir, del aparato locomotor [13].

Las razones de usar el caballo como modelo para el estudio de lesiones que se producen en tendones y ligamentos son diversas. Existen muchas similitudes entre la especie humana y equina en la fisiopatología del tendón y es un animal susceptible de ser entrenado y seguir un programa de rehabilitación ya que se utiliza como animal de deporte. Entre las lesiones que se producen en el tendón flexor digital superficial (TFDS) de los caballos de carreras y el tendón de Aquiles de los atletas humanos (Figura 1), existen muchas similitudes: estructura, función y tamaño similares, alta frecuencia de lesiones por sobreesfuerzo, alta frecuencia de recaída por formación de una cicatriz en el proceso de curación con propiedades biológicas y mecánicas inferiores al tendón.

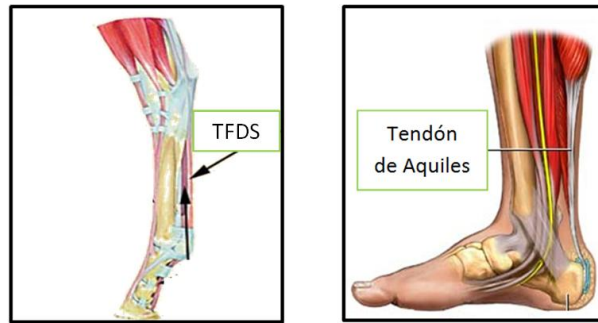


Figura 1. Comparación anatómica entre TFDS en caballo (izquierda) y tendón de Aquiles en humano (derecha).

Además de todas las razones mencionadas, otra fundamental hoy en día es la importancia económica que tiene este tipo de animales. Según un estudio publicado por la Real Federación Hípica Española en 2013, el sector económico del caballo en España representó en el año 2012 el 0'51 % del PIB, es decir, unos 5.303'6 millones de € anuales [14].

2.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCs

La necesidad de la caracterización de las células madre mesenquimales se hace evidente tras lo comentado con anterioridad. Antes de usarlas de forma generalizada para tratamientos en pacientes, son necesarios la caracterización y el desarrollo de metodologías adecuadas para su proliferación y expansión.

En la médula ósea, estas células tienen apariencia fibroblastoide, un núcleo prominente y una frecuencia media de 1 célula por cada $10^4 - 10^5$ células en la fracción mononuclear [2,15]. Sin embargo, en la sangre periférica son menos frecuentes.

2.4.1. Potencial de autorrenovación y proliferación

Estas células presentan la propiedad característica de las células madre de la autorrenovación, aunque a diferencia de las embrionarias, esta habilidad es finita y parece que las células acaban por detener su crecimiento *in vitro* tras largos periodos en cultivo. También se sabe que la cantidad de células y su capacidad de proliferación disminuyen con la edad del individuo y que el potencial de estas células puede verse alterado por el daño en el DNA nuclear.

Investigaciones realizadas sugieren que las MSCs entran en senescencia y empiezan a perder sus características de células madre de forma casi indetectable desde el comienzo del cultivo *in vitro*. El cultivo medio a largo plazo es de 118 días, mientras que el número de pases medio es de 9, descendiendo el potencial de diferenciación desde el sexto pase. El número promedio de doblaje de la población disminuye de 7'7 a 1'2 en el décimo pase. Las anomalías morfológicas de cultivo son típicas en los modelos de células de edades avanzadas (modelo de Hayflick) [16].

Debido a la heterogeneidad de poblaciones que presentan las MSCs, los resultados de los estudios sobre la capacidad de proliferación han sido muy variables, aunque todos ellos demuestran que las MSCs son capaces de mantenerse largos periodos de tiempo en cultivo sin diferenciarse.

2.4.2. Marcadores de superficie

Según se ha comentado en el Apartado 2.2., las MSCs no poseen un marcador de superficie único por el cual pueden ser seleccionadas, a diferencia de sus células vecinas de la médula ósea, las hematopoyéticas, que sí que poseen uno: CD34.

La identificación de las células por sus marcadores de superficie se realiza mediante citometría de flujo, detectando la presencia o no de cada marcador en la superficie de la célula. En el caso de las especies animales, resulta en muchas ocasiones dificultosa la aplicación de dicha técnica ya que para muchos de estos marcadores no existen anticuerpos específicos comercializados. La identificación de marcadores de superficie puede realizarse también con PCR a tiempo real, RT-qPCR, técnica de amplificación para la detección del mRNA.

Entre las moléculas examinadas en BM-MSCs humanas se encuentran integrinas (CD49a-f, STRO-1, CD29), cadherinas (CD144), enzimas (CD73, CD13), receptores de superficie (CD44), glicoproteínas (CD105), moléculas de adhesión (CD54, CD106, CD166, CD146) y los complejos mayores de histocompatibilidad MHC-I y MHC-II. Las MSCs de especies veterinarias, así como en humanos y ratón, expresan MHC-I pero no MHC-II o las moléculas coestimuladoras de linfocitos T CD86 y CD80 [10].

En la Tabla 1 representada a continuación se pueden comparar los marcadores tanto positivos como negativos para las MSCs humanas y equinas.

Tabla 1. Marcadores de superficie en MSCs humanas y equinas, determinados por citometría de flujo, RT-qPCR e inmunocitoquímica (Adaptada de [10]).

ESPECIE	FUENTE MSCs	MARCADOR POSITIVO	MARCADOR NEGATIVO
Humana	BM	MHC-I, CD13, CD29, CD44, CD49(a-c, e-f), CD50, CD54, CD73, CD90, CD102, CD105, CD106, CD146, CD166	MHC-II, CD11a-c, CD14, CD18, CD19, CD31, CD34, CD45, CD49d, CD56, CD79a, CD144
Equina	BM	MHC-I, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105	MHC-II, CD14, CD34, CD45, CD79a, CD86, F6B

(BM=Bone Marrow).

En contraposición con los datos aportados en la Tabla 1, algunos estudios realizados mediante RT-qPCR revelan que existe expresión de CD34 en las AT-MSCs de algunas especies. Aunque esta técnica muestra la expresión de mRNA de distintos marcadores, esta expresión no siempre está correlacionada con la presencia de la proteína. La detección de la proteína por otros métodos posiblemente podría complementar los resultados obtenidos [9].

Las discrepancias en la expresión de CD34 y STRO-1 en BM-MSC y AT-MSC en diferentes estudios pueden estar causadas por los diferentes métodos de aislamiento o composición de los medios, lo que podría resultar en una expresión diferente de las moléculas de superficie [17].

2.4.3. Potenciales de diferenciación

Estudios realizados con estas células *in vitro* e *in vivo* indican la habilidad que tienen para diferenciarse, no sólo a condrocitos, osteocitos y adipocitos, como criterio mínimo que declara la ISCT para considerarse MSCs, sino también, a músculo, precursores neuronales, tejidos miocárdicos, cardiomiocitos, tendón, y posiblemente otro tipo de células (Figura 2) [18].

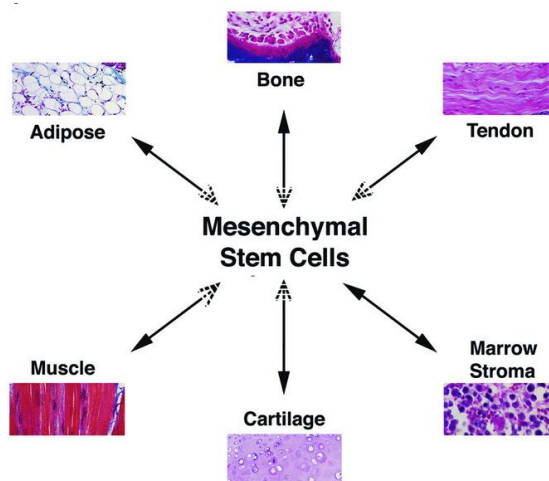


Figura 2. Diferentes linajes resultantes de la diferenciación de las MSCs (©2008, Chen and Tuan).

Conforme avanzan el número de pases, los potenciales de multidiferenciación *in vitro* se pierden, quedando la osteogénesis como único linaje al que las MSCs son capaces de diferenciarse [19].

2.4.4. Propiedades inmunológicas

Un conocimiento más profundo de los mecanismos por los cuales las MSCs modulan la inflamación y contribuyen al proceso de curación, beneficiará tanto a humanos como a animales [10].

Investigaciones realizadas demuestran que factores solubles o productos derivados de las MSCs, modulan la respuesta inmune y sugieren que crean un microambiente inmunosupresor capaz de modular el grado de reacción alógena incluso en presencia de $\text{IFN}\gamma$ [20].

Diversos estudios señalan que las MSCs humanas en cultivo secretan algunos factores importantes como son las Interleuquinas IL-6 (participa en reacciones de fase aguda y decrece la proliferación de las células T y su diferenciación a células maduras e inhibe además la secreción de citoquinas pro-inflamatorias) [21] e IL-8. Otros factores secretados son SDF-1, VEGF y PGE_2 (los efectos inmunomoduladores de las MSCs están mediados *in vitro* vía secreción de este último compuesto y pueden suprimir a las células NK). Además de con linfocitos T, las MSCs también interactúan con linfocitos B, células NK, células dendríticas, macrófagos y neutrófilos. Se ha demostrado que estas células interactúan con linfocitos T CD4 y CD8, y, una vez activadas en presencia de compuestos pro-inflamatorios ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$), secretan mediadores que disminuyen la inflamación y proliferación de linfocitos T [22].

La exposición de MSCs a moléculas pro-inflamatorias como $\text{TNF}\alpha$ o $\text{IL-1}\beta$ produce un aumento en la expresión de muchas moléculas quimioatrativas y estimuladoras de diferentes células inmunes. Entre estos factores solubles que median la inmunosupresión de las MSCs, se encuentra la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). La estimulación con $\text{IFN}\gamma$ hace que esta enzima metabolice el triptófano a quinurenina, que inhibe la activación de células T CD4^+ y CD8^+ , y, en menor alcance las células NK independientemente de la presencia de triptófano. Sato y colaboradores (2007) centraron su trabajo en la expresión de la enzima óxido nítrico-sintasa inducible (iNOS) de MSCs murinas, que produce óxido nítrico cuando es inducida en una situación inflamatoria. Dichos investigadores observaron que la inhibición de ésta abolía el efecto anti-proliferativo de las células T por las MSCs [23]. Otro factor implicado en la regulación inmune es COX-2, ya que produce el factor soluble PGE_2 . Se trata de una enzima que permite al organismo producir prostaglandinas a partir de ácido araquidónico. Tiene como función mediar en los procesos de inflamación y está presente en la señalización por prostanoïdes y se expresa tras inducción inflamatoria (mediadores inflamatorios como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$), aunque es constitutiva en SNC y riñón.

La Figura 3 muestra un esquema de cómo las MSCs realizan estos efectos inmunosupresores cuando están expuestas a un microambiente inflamatorio, a través de la inhibición de la proliferación de las células T, de la producción de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ y aumentando los niveles de IL-10, ya sea por medio de la secreción de moléculas o por medio del contacto célula-célula [24]. La inhibición de la proliferación de linfocitos *in vitro* produce tanto la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$), como la estimulación de la secreción de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10, $\text{TGF-}\beta$, PGE_2).

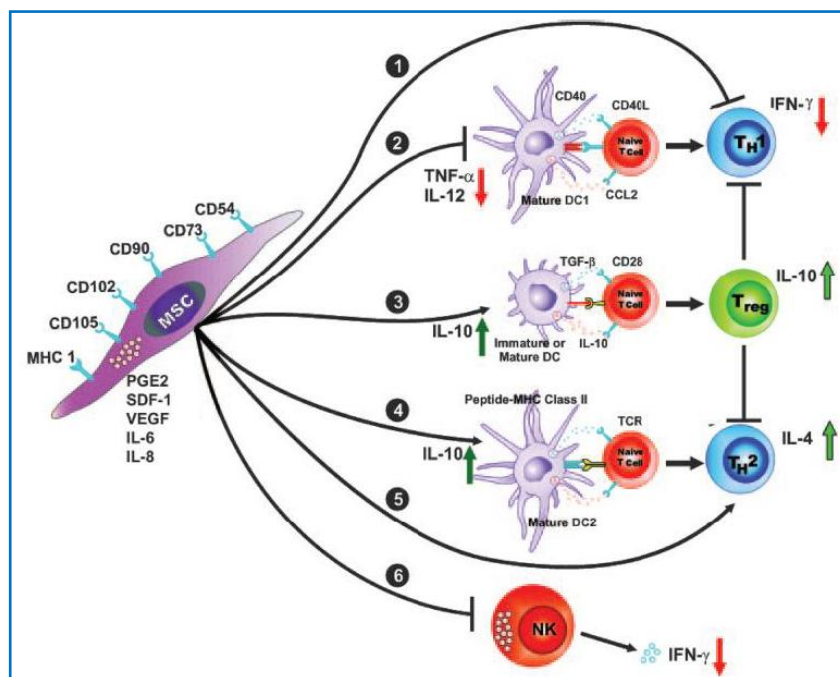


Figura 3. Esquema de los mecanismos de inmunoregulación de las MSCs sobre diferentes células del sistema inmunológico. Figura original de [24].

Actualmente se considera que las MSCs no sólo son células inmuno-inhibitorias, sino que bajo condiciones de reposo poseen propiedades antiapoptóticas y de apoyo hacia diferentes tipos celulares como células madre hematopoyéticas, células T, precursores de las células B, células plasmáticas y células neoplásicas. Además, pueden actuar como

células presentadoras de antígenos (APCs) y células pro-inflamatorias. Por consiguiente, la actividad moduladora no está constitutivamente expresada por las MSCs, sino que depende de un proceso de “licensing” (autorización) para ser adquirida. Este término define en una palabra el proceso multietapa que conlleva a la maduración funcional de las MSCs e implica [25]:

1. “Activación” de las MSCs por medio de citoquinas inflamatorias, como $\text{IFN}\gamma$ (Interferón γ) o $\text{TNF}\alpha$ (Factor de Necrosis Tumoral α) e $\text{IL-1}\alpha/\beta$ (Interleuquina 1 α/β), que son rápidamente producidas por diferentes células como consecuencia del procesamiento de antígenos y la activación celular del efector inmune.
2. La prevalencia del estímulo detonante en MSCs por señales que pueden obstaculizar sus mecanismos inhibitorios, como el desencadenamiento de los receptores tipo Toll (TLR) por agentes infecciosos o señales de daño endógenas.
3. La coordinación de la competencia de las MSCs en el proceso de activación de las células efectoras inmunes.

Otros resultados obtenidos en investigaciones realizadas, son las diferencias de la capacidad inmunosupresora encontradas en diferentes animales, y, entre diferentes tejidos del mismo animal; así como una mayor capacidad de inmunosupresión del tejido adiposo en relación a la médula ósea [10].

En determinadas condiciones, las MSCs no expresan MHC-II, lo que podría proponerlas como donantes universales, aunque se ha demostrado que bajo ciertos estímulos sí que pueden hacerlo. Como ya se ha comentado en el Apartado 2.3., se ha descrito que las MSCs ya no pueden ser consideradas como “inmuno-privilegiadas”, sino “inmuno-evasivas” para el sistema inmune.

La estimulación con citoquinas puede tener efectos adversos sobre las MSCs, por ejemplo sobre su proliferación y diferenciación, así como sobre su viabilidad. Una forma de valorar el efecto sobre la viabilidad es valorando el daño del DNA nuclear.

2.4.4.1. Valoración del daño del DNA

Existen técnicas que permiten una rápida valoración del daño del DNA de forma sencilla. Una de ellas fue desarrollada para determinar daño nuclear en espermatozoides. Está basada en la tecnología de SCDt (Sperm Chromatin Dispersion test) y está patentada por el Dr. Jaime Gosálvez de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta técnica recibe el nombre de Halosperm® para el caso de humanos y Halomax® para el caso de otros mamíferos (Halotech - DNA S.L., Madrid, España).

La técnica se basa en lisar la membrana del núcleo celular, haciendo que la cromatina salga del núcleo. Si la cromatina está intacta, veremos un pequeño halo denso alrededor del núcleo, pero si la cromatina está fragmentada porque hay daño del DNA, entonces los fragmentos se esparcirán en un gran halo alrededor del núcleo.

Para visualizar la cromatina es necesario marcarla con fluorocromos y utilizar microscopía de fluorescencia.

Esta técnica presenta ventajas frente a otras como SCSA, TUNNEL, ISNT o comet assay, como son el precio y la rapidez y facilidad de la misma [26].

3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es analizar la respuesta de las MSCs de la especie equina obtenidas de médula ósea (BM-MSCs) a un ambiente inflamatorio constituido por IFN γ y TNF α a una concentración de 5ng/ml en el medio de cultivo tras un periodo de 12 y 72h de exposición.

Para la consecución del objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1 Estudio del efecto de citoquinas pro-inflamatorias sobre potencial de proliferación de las MSCs obtenidas de médula ósea.
- 2 Análisis del daño del DNA nuclear de las MSCs inducido por citoquinas pro-inflamatorias.
- 3 Efecto de la exposición a citoquinas sobre la expresión de genes relacionados con la inmunomodulación: *IL-6* y *COX-2*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se va a detallar el material utilizado así como los aparatos y técnicas para llevar a cabo el Trabajo de Fin de Grado. Además de la descripción, se incluye también el objetivo de utilizar cada método.

4.1. ANIMALES

A lo largo de todo el trabajo se utilizaron 3 caballos como donantes del material de partida. Todos fueron machos, de pura raza español y con una edad en torno a los 8 años.

En todos los casos, las células madre mesenquimales obtenidas de estos animales derivan de la médula ósea.

4.2. CULTIVO Y EXPANSIÓN DE LAS MSCs

Para el manejo de estas células es necesaria la condición de esterilidad, por lo que se trabaja en una campana de flujo laminar y siempre con guantes y desinfectando con Desinflor (lleva detergente) y Etanol al 70%. El material utilizado está siempre estéril y se usan puntas de filtro para más prevención.

Las células se mantuvieron en medio completo de crecimiento compuesto por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bajo en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con 1% de L-Glutamina (Sigma-Aldrich), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) y 10% de suero fetal bovino, FBS (Gibco). Permanecieron en un incubador, en condiciones de 37°C, 5% de CO₂ y 20% de O₂ (normoxia). Además, DMEM es un medio de color rojizo que tiene un indicador de pH, rojo fenol, que vira a rosa cuando el cultivo envejece, lo que actúa como marcador para cambiarlo cada 3-4 días para que las células tengan siempre sus nutrientes para poder proliferar.

4.2.1. Método de expansión

Como ya se ha comentado con anterioridad, el medio de cultivo hay que cambiarlo cada 3-4 días para evitar que las células se queden sin nutrientes para su crecimiento. Así permanecieron hasta alcanzar aproximadamente el 80% de su confluencia. Este punto se conoce como Pase 0.

Una vez alcanzado este porcentaje, se procedió a la resiembra. Las MSCs son células que se adhieren al plástico, así que para realizar su levantamiento va a ser necesaria la digestión con 0'25% tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich). Este levantamiento de células consistió en la retirada del medio completo con una bomba de vacío, lavado de PBS para limpiar las células de FBS, ya que inactivan la enzima, añadir 0'5 ml de tripsina y mantenimiento en la estufa a 37°C durante 6 minutos. Tras los cuales, se añadieron 0'5 ml de FBS para detener la reacción de la enzima, se pasaron a Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 1750 rpm durante 5 minutos. Tras este tiempo se retiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de medio completo en el que se resuspendió el pellet celular.

En este punto ya pudieron ser sembradas a 5.000 células /cm² para llevar a cabo una segunda expansión hasta el 80% de confluencia, lo que correspondería con el Pase 1. Este proceso se repitió hasta alcanzar el Pase 3.

4.2.2. Método de congelación

Las células en Pase 3 se congelaron en criotubos en medio de congelación (90% FBS rico en factores de crecimiento y 10% DMSO, agente crioprotector). Además, para que la congelación no se haga de forma rápida, los criotubos se introdujeron en una cryobox que tiene un líquido (isopropanol) que permite la congelación de células con bajada progresiva de la temperatura para evitar daños en éstas. Se colocaron a -80°C durante 24h y posteriormente se congelan en N_2 líquido o en congelador de -150°C .

4.2.3. Método de descongelación

A partir de los criotubos con las células congeladas, las BM-MSCs de los tres animales en Pase 3, a -170°C en N_2 líquido, se pasaron a un baño de agua a 37°C tratando de que la descongelación sea rápida. Se recogió el contenido del criotubo y se pasó a un Falcon con medio completo frío, para evitar el efecto tóxico del DMSO a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1750 rpm durante 5 minutos, se recogió el pellet formado y se resuspendió en medio a 37°C .

4.2.4. Método de resiembra

Las células se siembran a una concentración de 5.000 células/ cm^2 . En este caso se resembraron en seis placas de seis pocillos cada una. Como la concentración inicial de células es diferente en cada muestra, se pusieron los μl necesarios de cada suspensión celular para conseguir esa concentración y se añadieron 2 ml de medio completo a cada pocillo.

4.3. VALORACIÓN DEL EFECTO DE CITOQUINAS SOBRE LAS MSCs

4.3.1. Diseño del experimento

Se realizó un experimento en el que se estudió el efecto de la adición de citoquinas sobre la viabilidad e inmunomodulación de las MSCs con respecto a unos controles.

De cada animal se sembraron dos placas de seis pocillos. Cada placa se empleó para estudiar un tiempo de exposición a citoquinas (12h y 72h). De los seis pocillos de cada placa se utilizaron tres pocillos para realizar la estimulación con citoquinas por triplicado, y los otros tres como control (también en triplicado).

Se incorporaron 5 ng tanto de $\text{TNF}\alpha$ como de $\text{IFN}\gamma$ por cada ml de medio de cultivo en cada uno de los pocillos positivos para las citoquinas, mientras que en los pocillos control se utilizó medio de cultivo basal descrito anteriormente.

4.3.2. Efecto sobre la viabilidad de las MSCs

Para determinar la cantidad de células se utilizó una Cámara de Neubauer. Se trata de un instrumento, que junto con un microscopio de contraste de fase, al que está adaptada, y, a 10 aumentos, se puede determinar las células presentes en cada preparación.

La cámara de Neubauer es un instrumento que presenta una cuadrícula central a cada lado, realizadas con un diamante, de dimensiones conocidas. Sobre ésta, se coloca un

cubreobjetos que queda fijo a ella por la tensión superficial, gracias a la muestra líquida añadida entre los dos objetos.

El volumen que cabe en cada cuadrícula es de 1 mm³ (0'0001 ml) y la fórmula para obtener la concentración de células es la siguiente:

$$N^{\circ}\text{células/ml} = \frac{n^{\circ}\text{ células contadas} \times \text{factor de dilución} \times 10^4\text{ml}}{n^{\circ}\text{ cuadrantes contados}}$$

Ecuación 1. Cálculo de la concentración de células obtenidas en el conteo con la cámara de Neubauer

El conteo realizado en este caso siempre era de los cuatro cuadrantes si el número de células no llegaban a las 100, como fue el caso.

Para poder realizar la distinción entre las células viables y no viables, se utilizó un colorante, el azul Trypan, que es capaz de penetrar en las células no viables ya que tienen rota su pared. Por la tanto, las células no viables adquieren una coloración azul, mientras que las viables permanecen intactas. Se puso la misma cantidad de muestra que de azul Trypan (9 µl de cada una), por lo que, al final, el factor de dilución es de 2 (1:1).

4.3.2.1. Sobre la capacidad de proliferación

Esta técnica permite establecer tiempos de doblaje, es decir, determinar cuánto tiempo tarda una población de células en multiplicar su cantidad inicial por 2.

Para ello, se midieron las mismas células expuestas a citoquinas durante diferentes tiempos y sus controles, transcurridos 8 días (para el caso de las células en las que se añadieron las citoquinas durante 72 horas) y 10 días (para la adición durante 12 horas). Una vez obtenidos los resultados, se aplicó la siguiente fórmula para establecer el DT, cell Doubling Time o tiempo de doblaje de la población:

$$DT = \frac{CT}{\ln \frac{N_f}{N_i}}$$

Ecuación 2. Cálculo del tiempo de doblaje de una población celular (DT)

Siendo CT= Tiempo transcurrido entre los conteos de las células; Nf= Número final de células; Ni= Número inicial de células.

4.3.2.2. Daño del DNA nuclear

Para determinar el daño del DNA de las MSCs expuestas a citoquinas y compararlas con los controles, se llevó a cabo una técnica sencilla, rápida y novedosa de valoración del daño del DNA. Para ello se usó la patente del Dr. Jaime Gosálvez cuyo nombre comercial es Halomax® y ha sido descrita en el Apartado 2.4.4.1. de Antecedentes.

El primer paso consistió en la fundición de agarosa al baño maría hasta que quede líquida y posteriormente conservarla a 37°C en un bloque térmico. A esa misma temperatura se añadieron 10 µl de la suspensión celular a valorar a los 50 µl de agarosa, se mezcló bien y se tomaron 10 µl de la mezcla y se depositaron en el centro del círculo del portaobjetos pre-tratado. Inmediatamente, para no dar tiempo a solidificar la agarosa, se puso un cubre encima y se presionó suavemente (con una punta de pipeta) para que se forme una fina capa de agarosa con células. Se dejó el porta a 4°C, 6 minutos para que solidifique la

agarosa. Una vez sólida, se retiró el cubre (hay que deslizarlo con un movimiento rápido y único, no levantarlo, para no romper la capa de agarosa con células). Una vez se tuvo el portaobjetos sin el cubre, se pasó, siempre en posición horizontal, por distintas bandejas de lavado: buffer de lisis 4 minutos, agua destilada 5 minutos, etanol al 70% 2 minutos y etanol al 100% 2 minutos. Por último, se dejó secar el portaobjetos con la preparación. El buffer de lisis aplicado en el primer paso es el encargado de romper la membrana nuclear de forma que el DNA salga del núcleo para poder visualizar su integridad.

4.3.2.2.1. Microscopía de fluorescencia

El microscopio de fluorescencia es una variación del microscopio de luz ultravioleta en la que los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda.

Sobre el portaobjetos seco, se añadió el fluorocromo para visualizar en el microscopio de fluorescencia. Los fluorocromos se prepararon a dilución 20x y a continuación se diluyen en el medio de montaje (Vectashield, Vector Laboratories) del que van acompañados a dilución 1:1 y hay que protegerlos de la luz. Con 3-5 µl de cada fluorocromo para cada preparación es suficiente. Se añadieron sobre la preparación y se puso un cubre encima. Primero ha de añadirse el fluorocromo verde (SYBRGreen). El rojo (Texas Red) desplaza al verde, quedando rojo el núcleo y verde el citoplasma. Es recomendable añadir los fluorocromos justo cuando se va a mirar la preparación, porque si se dejan tiempo, la fluorescencia difunde al gel de agarosa.

Si el DNA está dañado, no va a estar compactado en el núcleo, y, al romper esa membrana con el buffer de lisis, va a salir formando un gran halo, o bien, viéndose su contenido muy fragmentado.

4.3.3. Expresión de genes relacionados con la inmunomodulación

Los genes cuya expresión fue estudiada son *IL-6* (Interleuquina 6) y *COX-2* (Ciclo Oxigenasa 2). Como se ha visto en el Apartado 2.4.4. de Antecedentes, donde se describen las propiedades inmunológicas, la expresión de estos dos genes se ve aumentada en presencia de compuestos pro-inflamatorios como van a ser $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$, tratando así de disminuir la inflamación y proliferación de linfocitos T.

4.3.3.1. Extracción de mRNA

Como se partió de cultivos con menos de 500.000 células, éstas fueron lavadas con PBS y congeladas directamente en las placas de cultivo a -80 °C. La extracción de RNA y síntesis de cDNA se realizaron utilizando el kit comercial Cell to cDNA II (Ambion), con algunas modificaciones en las cantidades añadidas.

Este kit consistió en la adición de 50 µl de Cell Lysis II Buffer frío (en vez de 100 µl que indica el protocolo, porque la cantidad de células de la que se parte no es muy grande) en todas las muestras sobre el hielo, mezcla con la pipeta y pase a una placa de PCR limpia (siempre sobre el hielo). Se incubó a 75°C, 15 minutos en el termociclador para inactivar las RNAsas y se pasó al hielo. Se añadió 1 µl de DNase I (en vez de 2 µl porque en vez de añadir 100 µl se añadió la mitad) y se mezcló con vortex y se dio un pulso de centrifuga para recoger y volver a incubar a 37°C 15 minutos y a 75°C 5 minutos. Para realizar la síntesis del cDNA, hay que añadir a 10 µl de lisado celular (RNA), 6 µl de la Mezcla 1 (para 30

genes, 20 µl de cDNA), que contiene, 4 µl de dNTPs y 2 µl de oligodecámeros. Se mezcló y centrifugó para recoger, se incubó a 75°C, 3 minutos y se enfrió en hielo 2 minutos. Se añadió 4 µl de la Mezcla 2 (2 µl de 10 RT Buffer, 1 µl de M-MLV Retrotranscriptasa y 1 µl de RNase Inhibitor), se volvió a mezclar y se centrifugó para recoger. Se incubó a 42°C, 60 minutos y a 95°C, 10 minutos. Se diluyó la muestra en una proporción 1:5 (añadiendo a los 20 µl de la muestra 80 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas, Gibco) y se almacenó a -20°C hasta la realización de la RT-qPCR.

4.3.3.2. RT-qPCR

La Real Time-quantitative PCR o PCR cuantitativa a tiempo real, es una variante de la PCR convencional y es una técnica altamente sensible, que se usa cuando el material de partida es RNA, que por la transcriptasa reversa (RT) se transcribe a cDNA, siendo éste el molde usado para la reacción de PCR. Se usó en el trabajo para poder establecer cambios de expresión en el mRNA debido a la presencia citoquinas pro-inflamatorias, por lo que se aplicó tanto a las células control como en las tratadas con citoquinas.

El termociclador utilizado para la reacción tiene el nombre de Step-One™, de Applied Biosystems. Se trata de un aparato con una tecnología avanzada que usa tan sólo dos temperaturas para llevar a cabo la reacción completa. Realiza las siguientes etapas: 95°C 20 segundos para la activación de los reactivos y desnaturalización del cDNA, seguido de 40 ciclos de 95°C 3 segundos y 60°C 30 segundos (la temperatura óptima específica de cada primer se modifica en esta última etapa). Finalmente, se realiza una última etapa conocida como curva de Melting. Estas curvas permiten saber si se ha amplificado bien y si se ha obtenido uno o más productos de amplificación. Son específicas de este fluoróforo y se suelen utilizar como controles de calidad.

La técnica se fundamenta en el uso de fluorocromos que se intercalan en la cadena de cDNA emitiendo cierta cantidad de fluorescencia en función del número de copias del fragmento amplificado. Cuando se cuantifica la expresión de un gen se utilizan genes constitutivos (housekeeping genes), que sirven como control positivo de la PCR, ya que se están expresando continuamente. En este caso se usaron dos; *GAPDH* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y *β2M* (β-2-microglobulina). El fluoróforo utilizado fue la molécula intercalante de DNA SYBRGreen (se asocia a la molécula de ADN interactuando con la hendidura menor del ADN), cuya detección es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR en la reacción.

Para realizar la RT-qPCR se usó una mezcla de reacción que contenía 5 µl de Master Mix SYBR, 0.3 µl de primers (0.15 µl de cada uno, [300 nM]), 2 µl de cDNA diluido 1:5 y 2.7 µl de agua Gibco para obtener al final 10 µl totales en cada pocillo de la placa de PCR.

Cada muestra se procesó por triplicado y se añadieron otros tres pocillos que en lugar de cDNA contenían agua Gibco como controles negativos de la reacción. El sistema Step One nos proporciona el valor del C_T de cada muestra, es decir, el número del ciclo en el que comienza la fluorescencia para cada muestra (57, 59 y 60 Control y positivas para CK a las 12 y 72h, todas por triplicado). Lo que se hizo para tener resultados comparables, es referir los C_T de nuestros genes problema a los dos genes housekeeping. Como cada muestra se puso por triplicado, se calculó la media del C_T de cada gen housekeeping y el parámetro de Quantity para cada muestra: $Q_x = 2^{\min C_T - x}$. Se calculó la media geométrica de los Quantity de ambos housekeeping para cada muestra y se obtuvo así el factor de normalización (FN). Se calculó el Quantity de cada muestra de igual forma, para cada gen de interés por

separado. A continuación se obtuvo para cada muestra el parámetro Normalized Quantity (Quantity/FN), con el cual se trabajó después.

La secuencia de los cebadores usados se presenta en la Tabla 1 del Apartado de Anexos (Tabla 1 Anexo).

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la valoración de diferencias entre MSCs expuestas a citoquinas y controles para los parámetros explicados con anterioridad (la proliferación celular, el daño en el DNA nuclear y la expresión de genes por RT-qPCR), se hizo necesario el uso de la estadística para determinar si dichas diferencias eran significativas.

4.4.1. Test *t* de Student para muestras pareadas

Para poder comparar dos muestras sometidas a diferentes condiciones (ausencia o presencia de citoquinas) se realizó una prueba estadística que se conoce como *t* de Student para muestras pareadas. Este test permite relacionar dos variables entre sí y determinar si existen características significativas de una con respecto a la otra. Se escogió el dato de la distribución de dos colas, distribución de Gauss. Cuando $p < 0.05$, se establece que existen diferencias significativas entre las dos variables. Este test se aplicó para establecer diferencias entre MSCs expuestas y controles a los dos tiempos tratados en los parámetros de proliferación, daño del DNA y expresión génica de *IL-6* y *COX-2*. Así mismo, para cada grupo se calculó la media, la desviación estándar (SD) y el error estándar (SEM).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el material y la metodología descritos en el apartado anterior, se obtuvieron los resultados que a continuación se detallan.

5.1. PROLIFERACIÓN CELULAR

El efecto de las citoquinas (CK) en la capacidad de proliferación de los cultivos de MSCs fue más que notable. No sólo se produjo una disminución de la cantidad de células tras el tratamiento de las citoquinas, sino que también aparecieron algunas células con estructuras que dejan entrever que la proliferación disminuye. Estas células presentan un aspecto más redondeado, lo que significa que pierden su capacidad de adherencia al plástico.

En la Figura 4 se observa el efecto causado por las CK a las 72 horas de ser añadidas. Se puede observar una disminución notable de la cantidad, pasando de una confluencia del 100% (Figura 4a) al 40% (Figura 4b).

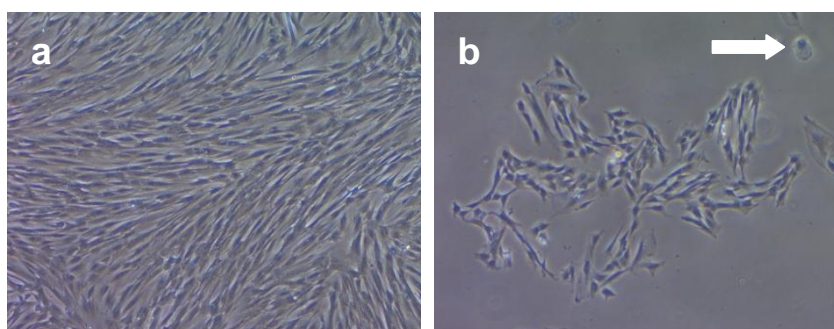


Figura 4. a) MSCs control tras 72 horas de cultivo sin adición de CK (10x), b) MSCs tratadas durante 72h con CK (10x) (La flecha blanca señala una célula con forma redondeada).

En la Tabla 2 se muestran los resultados del cálculo del tiempo de doblaje celular (DT). En el caso de las células a las que se añadieron CK durante 12h, se puede observar como la media del tiempo de doblaje de la población está en torno a los 4'88 días para las células control y 7 para las células en presencia de CK. Por lo tanto, se puede concluir que las células en presencia de CK tardan en torno a los días 2 más en duplicar su población inicial que las no tratadas con CK. Cuando se comparan los resultados obtenidos mediante un test de t de Student para muestras pareadas, las diferencias observadas no son estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Tabla 2. Cálculo de DT en los 3 animales a las 12h de la adición de las CK.

Animal	Control	CK	Animal	Control	CK	Animal	Control	CK
057			059			060		
DT	4'080	4'073	DT	5'486	6'647	DT	5'086	10'301

En el caso de las células tratadas con CK a las 72h, los resultados muestran que la media del DT para las células control es similar al observado en las células control del experimento de exposición durante 12h, a los 3'97 días las células duplican su población. Sin embargo, el valor de la media del DT para las células expuestas a CK durante 72h es negativo ya que la cantidad final de células disminuyó con respecto a la inicial, haciendo el \ln de su fórmula un valor negativo (Tabla 3).

Tabla 3. Cálculo de DT en los 3 animales a las 72h de la adición de las CK.

Animal	Control	CK	Animal	Control	CK	Animal	Control	CK
057			059			060		
DT	3'394	-83'749	DT	3'707	-55'435	DT	4'831	24'563

Los resultados obtenidos cuando se tiene en cuenta el número final de células tanto en los cultivos tratados con CK como en las controles para cada uno de los dos tiempos se muestran en la Figura 5 (12h) y Figura 6 (72h). En la Figura 5 se puede observar una gran variabilidad entre animales, ya que en el animal 57 la población permanece prácticamente inalterada, mientras que en los animales 59 y 60 el número de células disminuye notablemente. Las diferencias observadas no son estadísticamente significativas ($p>0'05$), lo cual corrobora el resultado obtenido cuando se calculan los DT en ambos grupos.

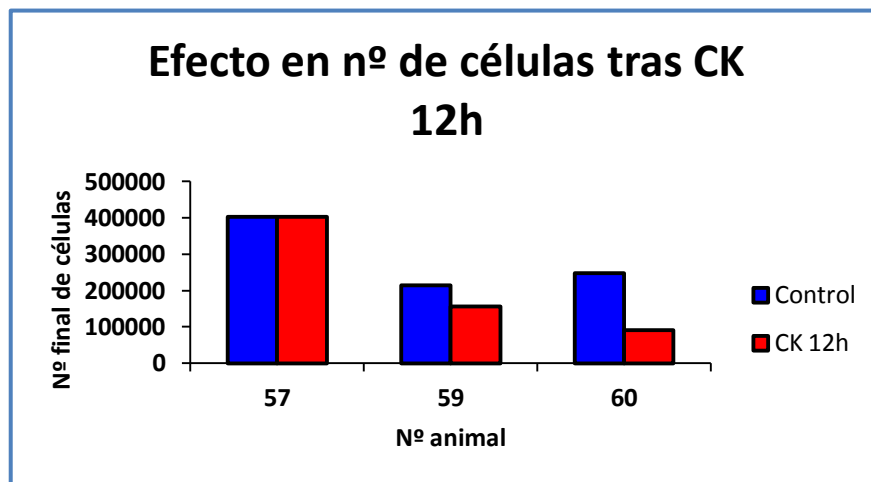


Figura 5. Efecto de las CK sobre el número final de MSCs tratadas durante 12h.

El número final de MSCs tras la exposición a CK durante 72 horas se muestran en la Figura 6. Aunque se observa de nuevo una gran variabilidad de respuesta en cada animal, en todos ellos se puede apreciar una acusada disminución de la población final de células, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p<0'05$).

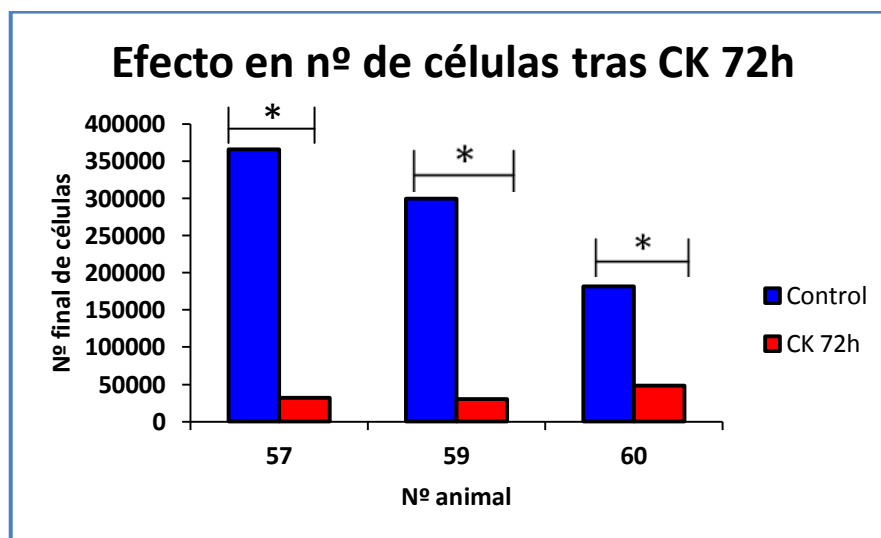


Figura 6. Efecto de las CK sobre el número final de MSCs tratadas durante 72h.

Estos resultados coinciden con estudios previos en los que se establece que la exposición a citoquinas pro-inflamatorias podría estar asociada al descenso de la viabilidad de las MSCs [27,28]. Otras investigaciones también demuestran en sus resultados que tras el tratamiento con $\text{IFN}\gamma$ de las MSCs equinas, la proliferación de éstas disminuye significativamente [29].

El tratamiento de MSCs derivadas de cordón umbilical humano con $\text{TNF}\alpha$ o con $\text{IFN}\gamma$ produce una disminución en el número de células en cultivo mediante diversos mecanismos, induciendo apoptosis o necrosis en función del tratamiento y dosis [30]. $\text{TNF}\alpha$ también induce apoptosis en BM-MSCs mediante la activación de la caspasa-7 [31]. La disminución en el número de células observada en nuestro estudio podría estar causada por la inducción de procesos de muerte celular programada. Este hecho podría comprometer la supervivencia de las células al ser introducidas en un medio rico en citoquinas como el que existe en las inflamaciones articulares.

5.2. EFECTO DE LAS CITOQUINAS SOBRE EL DAÑO DEL DNA NUCLEAR EN LAS MSCs

En la Figura 7 se puede observar la diferencia entre una célula sana, que tiene la cromatina compactada y no se dispersa, formando un pequeño halo (Figura 7a), y una célula que presenta daño nuclear, en la que la cromatina se fragmenta y los fragmentos se dispersan alrededor del núcleo formando un gran halo (Figura 7b).

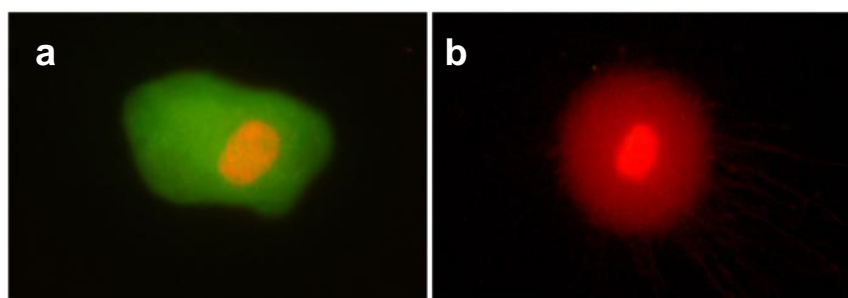


Figura 7. Microscopio de fluorescencia (20x) a) Célula equina sana b) célula con daño nuclear.

En la Figura 8 (elaborada a partir de los datos contenidos en Tabla 6 del Anexo) se muestra el porcentaje de células que presentan daño en su DNA nuclear y el porcentaje de células que no lo presentan tanto a las 12h como a las 72h.

El porcentaje células dañadas es de aproximadamente 10% y el de células que no presentan daño es del 90% tanto en las células control como en las expuestas a CK durante 12 o 72h.

Se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los dos grupos: controles y tratadas con citoquinas tanto a las 12h como a las 72 horas ($p > 0,05$).

El tratamiento con citoquinas como $\text{IFN}\gamma$ induce estrés oxidativo y daño en el DNA en células tumorales [32], sin embargo nuestro estudio demuestra que el tratamiento con estas moléculas no parece afectar a la integridad del DNA de las MSCs.

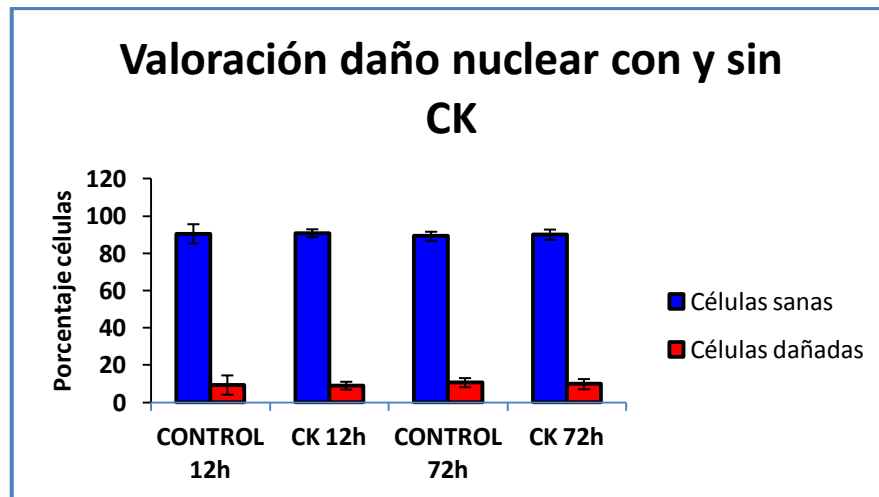


Figura 8. Valoración del daño nuclear en ausencia y presencia de citoquinas a las 12 y 72h.

5.3. EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA INMUNOMODULACIÓN

El resultado de la RT-qPCR realizada para la comparación de la expresión de los genes *IL-6* y *COX-2*, después la exposición de las MSCs a CK durante 12 y 72 horas, se describe a continuación.

En la Figura 9 (elaborada a partir de los datos contenidos en Tabla 7 del Anexo) se muestran los resultados obtenidos para *IL-6*. Se observa un aumento significativo de la expresión de *IL-6* que experimentan las MSCs expuestas a tratamientos de CK, en especial, las tratadas durante tiempos más largos (72h).

La expresión de *IL-6* experimenta un aumento de 493'55 veces en las células tratadas respecto a las células control para las 12h y de 722'64 veces para las células tratadas durante 72h. Sin embargo, la diferencia es más significativa a las 12h.

Las diferencias observadas en la expresión son estadísticamente significativas para los dos tiempos ($p < 0.01$ para las tratadas 12h y $p < 0.05$ para las tratadas durante 72h).

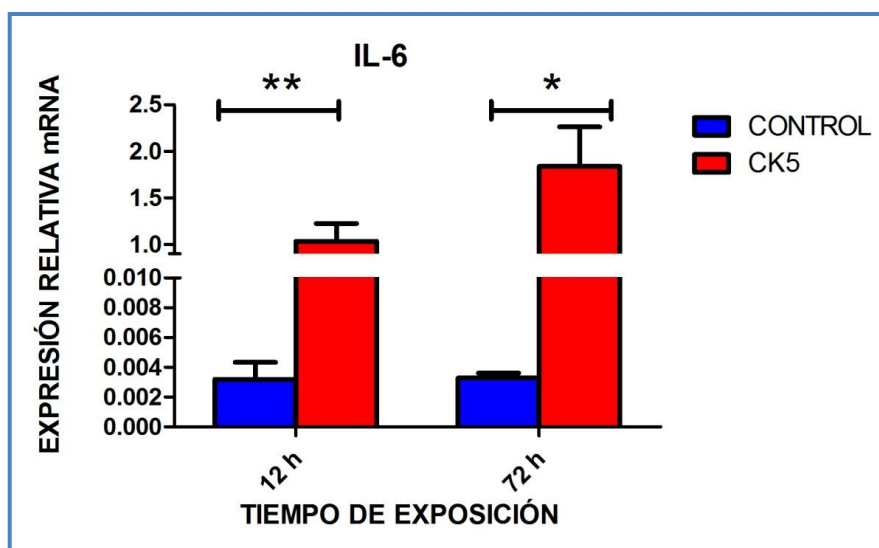


Figura 9. Comparación de la expresión de *IL-6* en células MSCs control y tratadas con CK durante 12 y 72h.

En la Figura 10 (elaborada a partir de los datos contenidos en Tabla 8 del Anexo) se observan los resultados obtenidos para la expresión del gen *COX-2*. El aumento, aunque no tan acusado como para el gen *IL-6*, también es muy significativo y se puede ver un aumento notable de la expresión.

La expresión del gen *COX-2* aumenta 7'81 veces en las MSCs tratadas durante 12h y 12 veces para las tratadas durante 72h.

Las diferencias en este caso también son estadísticamente significativas ($p < 0'05$).

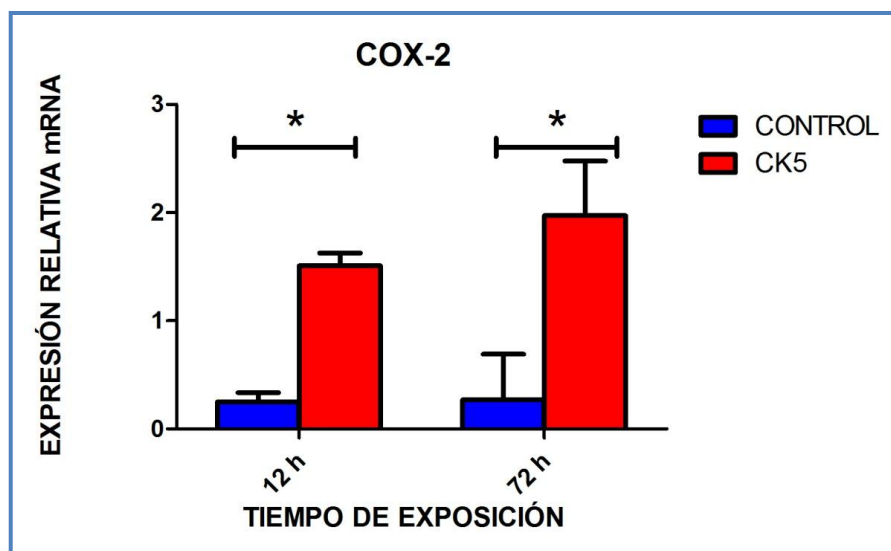


Figura 10. Comparación de la expresión de COX-2 en células MSCs control y tratadas con CK durante 12 y 72h.

Con estos resultados se concluye que la presencia de mediadores pro-inflamatorios como son $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ en el medio de cultivo de las MSCs, produce un aumento significativo de la expresión de dos genes relacionados con la inmunomodulación *IL-6* y *COX-2*, siendo este aumento más acusado en las células que han estado durante más tiempo en presencia de estos factores. En ambos genes, el aumento es más grande en 72 horas, pero en el gen *IL-6* el aumento es más significativo en las células tratadas con citoquinas durante 12h.

Se ha descrito que la exposición de las MSCs a $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$ aumenta su perfil inmunomodulatorio [33]. Nuestros resultados avalan los estudios realizados en MSCs murinas, en los que se observa cómo la estimulación de estas células con $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$ producen un aumento de la expresión del mRNA de *COX-2* [34] y del mRNA de *IL-6* [35]. En este trabajo se describe por primera vez el efecto que producen estas citoquinas en las MSC equinas.

6. **CONCLUSIONES**

Como consecuencia de los resultados obtenidos y en las condiciones experimentales utilizadas en el presente Trabajo de Fin de Grado se puede concluir que:

1. La presencia de citoquinas pro-inflamatorias, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ a una concentración de 5ng/ml, producen una disminución estadísticamente significativa de la capacidad de proliferación de las BM-MSCs equinas.
2. La adición de citoquinas pro-inflamatorias $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ a las MSCs en cultivo no provoca cambios significativos en la integridad de su DNA nuclear.
3. La estimulación de las MSCs con $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ induce una sobreexpresión de los genes *IL-6* y *COX-2*, siendo mucho más acusado en el primero de ellos y con tiempo de exposición de 72h.

CONCLUSIONS

As a consequence of the results obtained and under the experimental conditions used in the present Final Degree Project, the following conclusions have been drawn:

1. The presence of pro-inflammatory cytokines, such as $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IFN}\gamma$ in a concentration of 5ng/ml, produce a significant decrease in the proliferation ability of equine BM-MSCs.
2. The addition of pro-inflammatory cytokines $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IFN}\gamma$ to the MSCs in culture does not induce nuclear DNA damage.
3. The stimulation of MSCs with $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IFN}\gamma$ induce an overexpression of the genes *IL-6* and *COX-2*, being much more relevant in the first one and at an exposure time of 72h.

7. **BIBLIOGRAFÍA**

1. Alenzi FQB and Bahkali AH. *Stem cells: Biology and clinical potential*. African Journal of Biotechnology, 2011; 10(86): 19929-19940.
2. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK and Lalykina KS. *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell and Tissue Kinetics, 1970; 3: 393–403.
3. Scuteri A et al. *Mesenchymal stem cells neuronal differentiation ability: a real perspective for nervous system repair?* Current Stem Cell Research & Therapy, 2011; 6(2): 82-92.
4. Kim SC, Han DJ and Lee JY. *Adipose tissue derived stem cells for regeneration and differentiation into insulin-producing cells*. Current Stem Cell Research & Therapy, 2010; 5(2): 190-194.
5. Horwitz EM et al. *Clarification of the nomenclature for MSC: the international society for cellular therapy position statement*. Cytotherapy 2005; 7(5): 393–395.
6. Dominici M et al. *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006; 8(4): 315-317.
7. Zuk PA et al. *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Engineering, 2001; 7(2): 211-228.
8. Klein JD and Fauza DO. *Amniotic and placental mesenchymal stem cell isolation and culture*. Methods in Molecular Biology, 2011; 698:75-88.
9. Ranera B et al. *Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells*. Equine Veterinary Journal, 2012; 44(1): 33-42.
10. Carrade DD and Borjesson DL. *Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells in Veterinary Species*. Comparative Medicine, 2013; 63(3): 207–217.
11. Ankrum JA, Ong JF and Karp JM. *Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged*. Nature Biotechnology, 2014; 32: 252–260.
12. <https://clinicaltrials.gov/> Registro y base de datos mundial respaldada pública y privadamente por estudios clínicos de participantes humanos. Servicio de los Institutos Nacionales de Salud de U.S.
13. Cellular, Tissue and Gene Therapies Advisory Committee, 2005. *Cellular products for joint surface repair in FDA Center for Biologics Evaluation and Research*.
14. <http://www.rfhe.com/> Estudio del impacto del sector ecuestre en España. Resumen ejecutivo (2013).
15. Gronthos S and Simmons PJ. *The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors*. J Hematother, 1996; 5: 15-23.
16. Bonab MM et al. *Aging of mesenchymal stem cell in vitro*. BMC Cell Biology, 2006; 7: 14.
17. Hass R, Kasper C, Böhm S and Jacobs R. *Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC*. Cell Commun Signal, 2011; 9: 12.
18. Nasef A, Fouillard L, El-Taguri A and Lopez M. *Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Libyan Journal of Medicine, 2007; 2(4): 190–201.
19. Muraglia A, Cancedda R and Quarto R. *Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model*. Journal of Cell Science, 2000; 113 (Pt 7): 1161-1166.

20. Ryan JM, Barry F, Murphy JM and Mahon BP. *Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells.* Clinical & Experimental Immunology, 2007; 149(2): 353-363.
21. Xu G, Zhang Y, Zhang L, Ren G, Shi Y. *The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells.* Biochemical and biophysical research communications, 2007; 361: 745-750.
22. Singer NG and Caplan AI. *Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation.* Annual Review of Pathology, 2011; 6: 457-478.
23. Sato K et al. *Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells.* Blood, 2007; 109(1):228–234.
24. Aggarwal S and Pittenger MF. *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses.* Blood, 2005; 105(4): 1815-1822.
25. Krampera M. *Mesenchymal stromal cell “licensing”: a multistep process.* Leukemia, 2011; 25: 1408-1414.
26. Fernández et al. *Halosperm® is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation.* Fertility and Sterility, 2005; Vol. 84, No. 4.
27. Liu Y et al. *Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN γ and TNF- α .* Nature Medicine, 2011; 17(12):1594-1601.
28. Wang L et al. *IFN γ and TNF- α synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NF κ B signaling.* Stem Cells, 2013; 31(7):1383-1395.
29. Paterson YZ et al. *Equine mesenchymal stromal cells and embryo-derived stem cells are immune privileged in vitro.* Stem Cell Research & Therapy, 2014; 5:90.
30. Li X, Du W, Ma FX, Feng X, Bayard F and Han ZC. *High Concentrations of TNF- α Induce Cell Death during Interactions between Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells.* PLoS ONE, 2015; 10(5): e0128647.
31. Mao J, Lv Z and Zhuang Y. *MicroRNA-23a is involved in tumor necrosis factor- α induced apoptosis in mesenchymal stem cells and myocardial infarction.* Experimental and Molecular Pathology, 2014; 97(1):23-30.
32. Hubackova S et al. *IFN γ induces oxidative stress, DNA damage and tumor cell senescence via TGF β /SMAD signaling-dependent induction of Nox4 and suppression of ANT2.* Oncogene, 2015.
33. Renner P et al. *Mesenchymal stem cells require a sufficient, ongoing immune response to exert their immunosuppressive function.* Transplantation proceedings, 2009; 41(6):2607-2611.
34. English K et al. *IFN γ and TNF- α differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells.* Immunology Letters, 2007; 110(2):91-100.
35. Hegyi B, Kudlik G, Monostori E and Uher F. *Activated T-cells and pro-inflammatory cytokines differentially regulate prostaglandin E2 secretion by mesenchymal stem cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012; 419(2):215-220.